昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, November 2007, 50(11):1111－1115 ISSN 0454-6296

粉纹夜蛾颗粒体病毒增强蛋白锌离子结合域定点突变

尹　隽,单　梁,宋大新,钟　江*

(复旦大学生命科学学院,微生物学与微生物工程系,上海　200433)

摘要:粉纹夜蛾颗粒体病毒(*Trichoplusia ni* granulovirus, TnGV)增强蛋白(enhancin)具有增强病毒感染力的作用。该蛋白包含一个多种杆状病毒增强蛋白都具有的保守结构域 HELGH,是典型的金属蛋白酶锌离子结合域,但该结构域对增强蛋白生物活性的重要性尚未得到研究。本研究通过定点突变构建了该结构域的 5 个氨基酸分别突变为 2 种不同氨基酸的共 10 种增强蛋白突变体基因,并用杆状病毒载体进行了重组表达。活性测定发现,10 种突变型增强蛋白大部分都丧失了野生型增强蛋白所具有的降解粉纹夜蛾幼虫围食膜粘蛋白的生物学功能,只有 1 种(第 4 位 G 突变为 A)保留该生物学活性。这一结果表明锌离子结合域对增强蛋白生物活性具有重要作用,也提示增强蛋白确是一种金属蛋白酶。

关键词:杆状病毒;增强蛋白;金属蛋白酶;围食膜;定点突变

中图分类号:Q966　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2007)11-1111-05

Site-directed mutagenesis of the zinc-binding domain of *Trichoplusia ni* granulovirus enhancin

YIN Juan, SHAN Liang, SONG Da-Xin, ZHONG Jiang* (Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: *Trichoplusia ni* granulovirus (TnGV) enhancin can enhance the infectivity of virus in several insect hosts. It has a conserved zinc-binding domain commonly found in metalloproteases, HELGH, which is also present in enhancin proteins from other baculoviruses. In the current work, each of the five amino acids in the domain was mutated to be two different amino acids, and the total 10 mutant enhancin genes were used to construct recombinant AcMNPV. The expression of enhancin proteins was observed in virus-infected cells. Peritrophic membrane (PM) assay indicated all but one mutant lost the ability to degrade the insect intestinal mucin in PM. The only exception was the mutant in which glycine in position 4 was mutated to alanine. The results showed that the zinc-binding domain in enhancin was essential for the activity of the protein, and also suggest that baculovirus enhancin is a metalloprotease.

Key words: Baculovirus; enhancin; metalloprotease; peritrophic membrane; site-directed mutagenesis

杆状病毒(baculovirus)是一种感染昆虫的双链 DNA 病毒,长期以来被认为是具有很大潜力的生物杀虫剂。杆状病毒分成核型多角体病毒(nucleopolyhedrovirus, NPV)和颗粒体病毒(granulovirus, GV)两个属。杆状病毒增强蛋白(enhancin),又称协同因子(synergistic factor),或病毒增效因子(virus enhancing factor),因其能提高一些 NPV 的感染力而得名(Yamamoto and Tanada, 1978, 1980; Roelvink *et al*., 1995)。增强蛋白最初在 GV 中发现(Hashimoto *et al*., 1991; Roelvink *et al*., 1995),但近年在多种 GV 和 NPV 的基因组中都发现了增强蛋白的类似基因(Bischoff and Slavicek, 1997; Hayakawa *et al*., 1999; Kuzio *et al*., 1999; Popham *et al*., 2001),并发现这些增强蛋白对提高病毒感染昆虫的能力有意义(Li *et al*., 2003)。同时,在一些细菌如耶尔森氏菌、芽孢杆菌中也发现了与杆状病毒增强蛋白具有一定的同源性(20% ~ 30%)的基因,但它们并没有增强病毒毒性的作用(Galloway *et al*.,

---

基金项目:国家自然科学基金项目(39870006)

作者简介:尹隽,女,1969 年 4 月生,学士,讲师,研究方向为昆虫病毒学,E-mail:yinjuan@fudan.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail:jzhong@fudan.edu.cn

收稿日期 Received:2007-05-28;接受日期 Accepted:2007-09-17

2005；Hajaij-Ellouze *et al*.，2006)，在细菌中的具体生物学功能还不清楚。

关于增强蛋白的作用机理，有两种假说。一种假说认为增强蛋白是一种金属蛋白酶(Lepore *et al*.，1996)，可以降解昆虫中肠起防御保护作用的围食膜的主要蛋白成分——昆虫肠道粘蛋白(insect intestinal mucin，IIM)，从而破坏围食膜，增加病毒与昆虫中肠细胞接触的机会，提高病毒感染效率(Derksen and Granados，1988；Lepore *et al*.，1996；Peng *et al*.，1999)。另一种假说则认为增强蛋白可以同时与病毒囊膜和细胞质膜结合，从而增强病毒与中肠细胞的融合(Tanada，1985；Wang *et al*.，1994)。

与上述第一种假说相一致，许多增强蛋白的氨基酸序列中都带有一个典型的锌离子结合位点HEXXH motif，是金属蛋白酶的特征性结构域(Lepore *et al*.，1996)。但该保守域对增强蛋白活性的重要性还没有得到研究。本研究通过定点突变的方法逐个改变了粉纹夜蛾颗粒体病毒(*Trichoplusia ni* GV，TnGV)增强蛋白该保守域中的氨基酸，并通过杆状病毒表达系统表达制备的突变蛋白，证明该位点的氨基酸序列对增强蛋白降解围食膜的能力具有决定性作用。

1 材料和方法

1.1 细胞、基因和病毒

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 细胞株 Sf21 以含 10% 小牛血清和抗生素的 TMN-FH 培养基(Sigma)培养，温度为 27℃。TnGV 增强蛋白基因质粒 pBBH2CTnEn 由美国 Boyce Thompson Institute (Ithaca，NY) R. Granados 教授惠赠。粉纹夜蛾中肠围食膜由美国康奈尔大学昆虫系 P. Wang 博士惠赠。

1.2 锌离子结合域氨基酸突变的增强蛋白基因的克隆

质粒 pBBH2CTnEn 带有完整的 TnGV 增强蛋白基因。在锌离子结合域 HELGH 附近有一个唯一的 *Nsi* Ⅰ位点(图 1)。利用该位点设计共 10 条引物，在 HELGH 位点中引入定向突变。该组引物分别与上游的 *Sph* Ⅰ位点的一引物组合，以 p2CTnEn 质粒为模板，进行 PCR。引物序列均见图 1。反应条件为 94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 30 s，共 30 个循环。扩增的产物(537 bp)经 *Nsi* Ⅰ和 *Sph* Ⅰ双酶切后，分别连接到同样经 *Nsi* Ⅰ和 *Sph* Ⅰ双酶切的质粒 pBBH2CTnEn，置换其中原有的野生型片段，即得到带有 HELGH 位点 5 个氨基酸分别突变的增强蛋白基因质粒(图 1)，即第 1 位的组氨酸分别突变为天冬氨酸和酪氨酸的 pBBH2CTnEn-1HD、pBBH2CTnEn-1HY，第 2 位的谷氨酸分别突变为丙氨酸和赖氨酸的 pBBH2CTnEn-EA、pBBH2CTnEn-EK，第 3 位的亮氨酸分别突变为精氨酸、缬氨酸的 pBBH2CTnEn-LR，pBBH2CTnEn-LV，第 4 位的甘氨酸分别突变为丙氨酸和精氨酸的 pBBH2CTnEn-GA、pBBH2CTnEn-GR，以及第 5 位的组氨酸分别突变为天冬氨酸和酪氨酸的 pBBH2CTnEn-5HD、pBBH2CTnEn-5HY。每个质粒都通过测序确认序列的正确性。

1.3 表达定点突变增强蛋白的重组杆状病毒的构建

上述各野生型和突变型增强蛋白基因质粒的骨架均为 pBlueBacHis2C(Invitrogen)，系构建重组杆状病毒 AcMNPV(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus)用的转移载体，带有多角体启动子和多角体基因两侧的同源重组序列。各增强蛋白基因位于多角体启动子下游，并与 6xHis 标签序列融合，以利筛选。用上述 10 个突变型增强蛋白基因质粒及野生型增强蛋白的质粒 pBBH2CTnEn 分别与线性化的杆状病毒 AcMNPV 基因组 DNA 用 Cellfectin(Invitrogen)共转染 Sf21 细胞。转染后 4 天收集上清，用空斑法挑取 X-gal 显色阴性，不产生多角体的重组病毒空斑，用 96 孔板稀释法进一步纯化 2 次。得到 1 株表达野生型增强蛋白和 10 株表达各突变型增强蛋白的重组病毒。

1.4 重组蛋白的表达分析

用表达野生型和突变型增强蛋白的重组 AcMNPV 分别感染 Sf21 细胞，4 天后收集细胞，用 PBS(phosphate-buffer saline)轻洗 1 遍后，进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western blot 分析。SDS-PAGE 按标准方法进行，凝胶浓度为 8%。Western blot 所用第一抗体为兔抗 6xHis-tag 抗体，第二抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体。用 BCIP/NBT 显色。

1.5 增强蛋白活性分析

增强蛋白活性分析以围食膜降解实验进行(Lepore *et al*.，1996；Wang and Granados，1997；李志广等，2002)。从粉纹夜蛾 5 龄幼虫中解剖得到围食膜，用蒸馏水漂洗，存于 -20℃待用。用野生型 AcMNPV 和 11 株重组 AcMNPV 感染 Sf21 细胞，4 天

后收集细胞，用 PBS 缓冲液洗 1 遍，细胞沉淀悬浮在 100 μL 20 mmol/L Tris pH 8.5 的缓冲液中，反复在液氮和 37℃水浴中冻融 3 遍，裂解细胞。对细胞裂解液进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析（同 1.4）。根据 Western blot 条带亮度，取适量细胞裂解液，用 20 mmol/L Tris pH 8.5 调节到 50 μL，加入一条围食膜，27℃反应 45 min。反应后的样品用 SDS-PAGE 和 Western blot 分析，Western blot 第一抗体为兔抗粉纹夜蛾幼虫肠道粘蛋白 IIM 抗体（美国 Boyce Thompson Institute R. Granados 教授惠赠）。第二抗体和显色方法同上。

2　结果与分析

2.1　表达突变增强蛋白的重组 AcMNPV 的构建

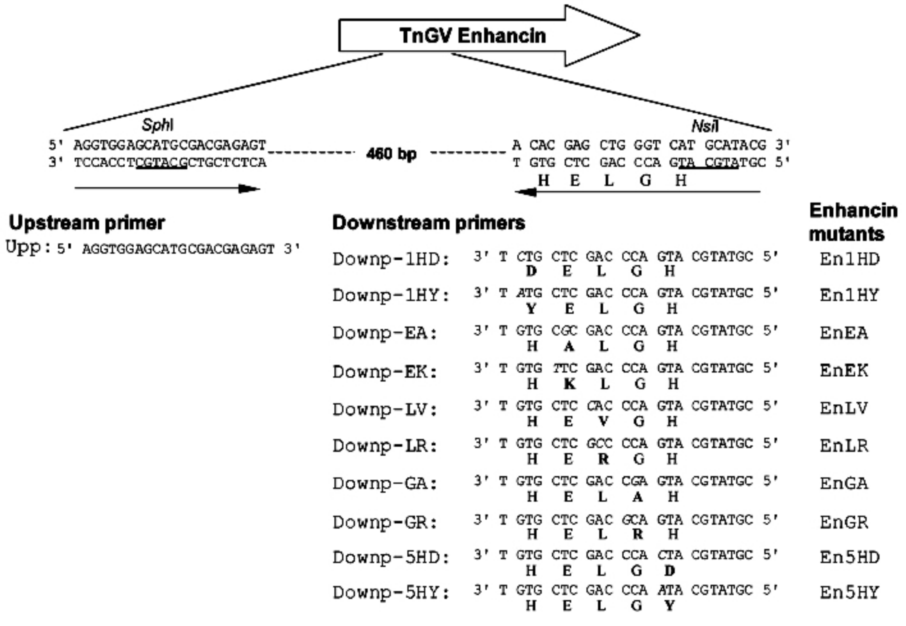
在含野生型 TnGV 增强蛋白基因的质粒 pBBH2CTnEn 的基础上，通过 PCR 介导的定向突变法构建了 10 个在增强蛋白锌离子结合域的 5 个核心氨基酸发生氨基酸改变的突变型基因，其中每个氨基酸分别突变成 2 个不同的氨基酸，一个与原氨基酸的性质接近，另一个差别较大，具体突变见图 1。突变型增强蛋白根据突变前后氨基酸命名，分别为 En1HD，En1HY，EnEA，EnEK，EnLV，EnLR，EnGA，EnGR，En5HD 和 En5HY。由于 5 个核心氨基酸中 1，5 位都是组氨酸，命名时用数字区分。

2.2　增强蛋白突变体在重组病毒感染的 Sf21 细胞中的表达

AcMNPV 本身没有增强蛋白类似基因。用带有野生型和突变型增强蛋白基因的转移载体，共 11 个质粒，分别与线性化的野生型 AcMNPV 基因组 DNA 共转染 Sf21 细胞，经分离、克隆化，得到相应的 11 个重组病毒，分别表达野生型增强蛋白和 10 种不同的突变型增强蛋白。病毒感染细胞样品用 SDS-PAGE 及 Western blot 分析，结果表明，各重组病毒株都表达了约 109 kD（含 5′端 6xHis 序列）的野生型和突变型增强蛋白（图 2，3），但 EnEK 的蛋白水平较低，有降解条带。

2.3　增强蛋白的活性分析

用围食膜降解法分析了重组突变型增强蛋白的活性。用表达 10 个重组突变型增强蛋白及野生型增强蛋白的细胞裂解液分别与粉纹夜蛾围食膜共同孵育。反应后将反应液进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析，检测围食膜的主要蛋白成分 IIM 的降解情况。未降解的 IIM 系分子量高达 200 kD 以上的蛋白，增强蛋白可以将它降解，形成小分子量的蛋白（Lepore *et al*.，1996；Wang and Granados，1997；李志广等，2003）。Western blot 的结果表明野生型增强蛋白确能将 IIM 降解为小分子量的蛋白（图 4），但 10 个突变型增强蛋白中，仅突变型 EnGA 具有明显的降解围食膜 IIM 的活性，在小分子量区域出现明显的可与抗 IIM 抗体发生反应的条带（图 4）。其余突变型增强蛋白均未检测到降解 IIM 的活性。



TnGV Enhancin
SphI
NsiI
5' AGGTGGAGCATGCGACGAGAGT
3' TCCACCTCGTACGCTGCTCTCA
460 bp
A CAC GAG CTG GGT CAT GCATACG 3'
T GTG CTC GAC CCA GTA CGTATGC 5'
H E L G H
Upstream primer
Upp: 5' AGGTGGAGCATGCGACGAGAGT 3'
Downstream primers
Enhancin mutants
Downp-1HD: 3' T CTG CTC GAC CCA GTA CGTATGC 5' D E L G H En1HD
Downp-1HY: 3' T ATG CTC GAC CCA GTA CGTATGC 5' Y E L G H En1HY
Downp-EA: 3' T GTG CGC GAC CCA GTA CGTATGC 5' H A L G H EnEA
Downp-EK: 3' T GTG TTC GAC CCA GTA CGTATGC 5' H K L G H EnEK
Downp-LV: 3' T GTG CTC CAC CCA GTA CGTATGC 5' H E V G H EnLV
Downp-LR: 3' T GTG CTC GCC CCA GTA CGTATGC 5' H E R G H EnLR
Downp-GA: 3' T GTG CTC GAC CGA GTA CGTATGC 5' H E L A H EnGA
Downp-GR: 3' T GTG CTC GAC GCA GTA CGTATGC 5' H E L R H EnGR
Downp-5HD: 3' T GTG CTC GAC CCA CTA CGTATGC 5' H E L G D En5HD
Downp-5HY: 3' T GTG CTC GAC CCA ATA CGTATGC 5' H E L G Y En5HY

图 1　PCR 介导 TnGV 增强蛋白基因的定点突变图示

Fig. 1　Diagram of PCR-mediated site-directed mutagenesis of TnGV enhancin

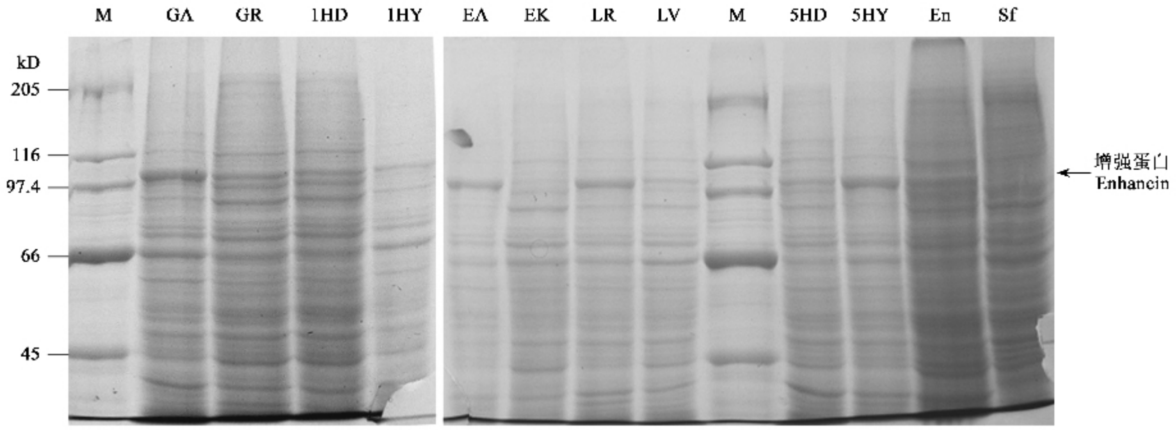


图 2 SDS-PAGE 分析重组 AcMNPV 感染的 Sf21 细胞表达野生型和突变型增强蛋白

Fig. 2 Expression of wild type and mutant enhancin in recombinant AcMNPV infected Sf21 cells detected by SDS-PAGE analysis

Sf：未感染细胞 Uninfected cells；M：蛋白分子量标准 Molecular weight marker；En：表达野生型 TnGV 增强蛋白的 AcMNPV Recombinant AcMNPV expressing wild type TnGV enhancin；GA，GR，1HD，1HY，EA，EK，LR，LV，5HD，5HY：表达 10 种突变型增强蛋白的重组 AcMNPV Recombinant AcMNPV expressing 10 mutated TnGV enhancin，respectively. 下图同 The same for the following figures.

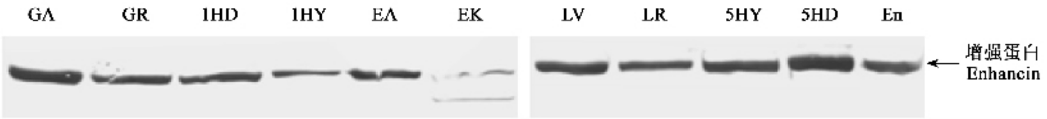


图 3 Western blot 分析重组 AcMNPV 感染的细胞中野生型和突变型增强蛋白的表达

Fig. 3 Expression of wild type and mutant enhancin in recombinant AcMNPV-infected Sf21 cells detected by Western blot

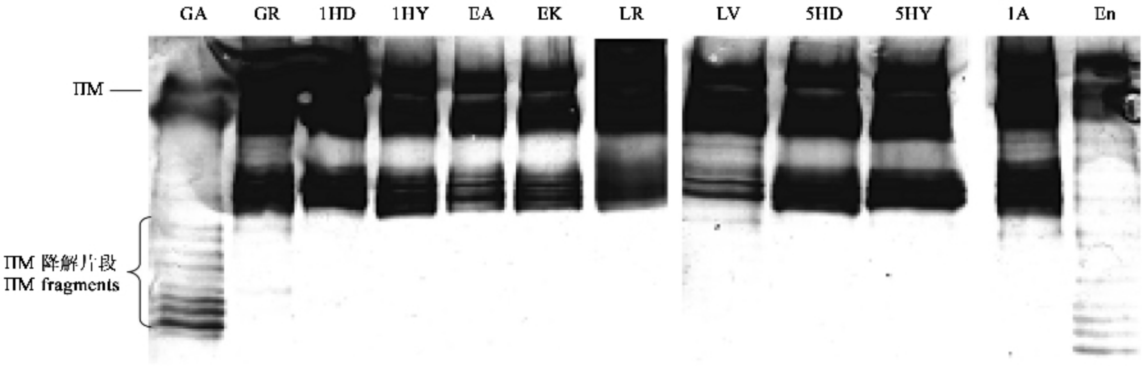


图 4 Western blot 分析突变型增强蛋白降解 IIM 的生物活性

Fig. 4 IIM-degradation-activity of mutant enhancin detected by Western blot

1A：野生型 AcMNPV Wild type AcMNPV.

3 讨论

Lepore 等（1996）首先提出增强蛋白是一种金属蛋白酶，主要依据有两方面，一方面，增强蛋白降解围食膜的活性受二价阳离子的影响，当有 EGTA 存在时，其降解围食膜的活性被抑制；另一方面，当时各种已知的增强蛋白序列中都带有金属蛋白酶的特征性锌离子结合结构域 HEXXH。这个特征结构域在后来发现的大部分增强蛋白中也同样存在（表 1）。Wang 和 Granados（1997）进一步证实增强蛋白作为金属蛋白酶的底物正是昆虫幼虫中肠围食膜的主要蛋白成分之一 IIM。尽管如此，HEXXH 结构域对于增强蛋白活性的必要性并没有得到直接的证实。

本研究以 TnGV 增强蛋白为对象，针对其金属蛋白酶特征结构域 HELGH（组氨酸-谷氨酸-亮氨酸-甘氨酸-组氨酸），用定点突变和杆状病毒表达载体

表 1　一些病毒增强蛋白中锌离子结合结构域的氨基酸序列

Table 1　Amino acid sequences of the zinc binding domains of viral enhancins

病毒增强蛋白 Viral enhancins	锌离子结合域 Zinc binding domain	GenBank 序列号 GenBank accession no.
Trichoplusia ni GV enh	HELGH	BAA02141
Pseudaletia unipuncta GV enh	HELGH	BAA03587
Helicoverpa armigera GV enh	HELGH	BAA05908
Choristoneura fumiferana GV enh	HELGH	AAG33872
Xestia c-nigrum GV enh-2	HEIGH	AAF05266
Xestia c-nigrum GV enh-3	HELGH	AAF05268
Lymantria dispar NPV enh-1	HEIGH	AAC70251
Lymantria dispar NPV enh-2	HEIGH	AAC70346
Choristoneura fumiferana MNPV enh	HEIAH	AAP29820
Mamestra configurata NPV-A enh	HEIAH	AAM09197
Mamestra configurata NPV-B enh	HEIAH	AAM95075
Agrotis segetum NPV enh-2	HEMAH	AAZ38242

enh：增强蛋白 Enhancin；GV：颗粒体病毒 Granulovirus；NPV：核型多角体病毒 Nucleopolyhedrovirus.

构建并表达了 5 个氨基酸分别发生突变的共 10 个突变型增强蛋白，每个氨基酸分别突变成一种与之较类似的和一种差别较大的氨基酸，同时还表达了野生型 TnGV 增强蛋白。通过 SDS-PAGE 和 Western blot 验证了各重组增强蛋白的表达，其中 EnEK 的表达水平较低，并有降解，提示该突变可能影响蛋白的稳定性。

在此基础上，通过围食膜降解实验，比较了野生型和各突变型增强蛋白的生物活性。结果表明，HELGH 结构域确实对 TnGV 增强蛋白降解围食膜中 IIM 蛋白具有关键作用。几乎所有的突变型增强蛋白都丧失了金属蛋白酶的活性，只有第 4 位甘氨酸突变为丙氨酸的突变型（EnGA）具有类似野生型增强蛋白的降解 IIM 活性。由于甘氨酸与丙氨酸结构非常类似，这一结果是可以预料的。同时在一些天然增强蛋白中也有第 4 位是 A 的，如 *Choristoneura fumiferana* MNPV，*Mamestra configurata* MNPV-A 和 *M*. *configurata* MNPV-B 的增强蛋白（表 1）。

本研究证实了 TnGV 增强蛋白的 HELGH 结构域与其降解围食膜的活性有直接关系。这一结果也再次提示增强蛋白确是通过降解围食膜来提高病毒感染昆虫的能力。这些结果可能为有效地利用增强蛋白提高病毒杀虫剂的杀虫效率提供理论依据。

参 考 文 献（References）

Bischoff DS，Slavicek JM，1997. Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *J*. *Virol*.，71：8 133 – 8 140.

Derksen ACG，Granados RR，1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*，167：242 – 250.

Galloway CS，Wang P，Winstanley D，Jones IM，2005. Comparison of the bacterial enhancin-like proteins from *Yersinia* and *Bacillus* spp. with a baculovirus enhancin. *J*. *Invertebr*. *Pathol*.，90：134 – 137.

Hajaij-Ellouze M，Fedhila S，Lereclus D，Nielsen-LeRoux C，2006. The enhancin-like metalloprotease from the *Bacillus cereus* group is regulated by the pleiotropic transcriptional activator PlcR but is not essential for larvicidal activity. *FEMS Microbiol*. *Lett*.，260：9 – 16.

Hashimoto Y，Corsaro BG，Granados RR，1991. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *J*. *Gen*. *Virol*.，72：2 645 – 2 651.

Hayakawa T，Ko R，Okano K，Seong SI，Goto C，Maeda S，1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology*，262：277 – 297.

Kuzio J，Pearson MN，Harwood SH，Funk CJ，Evans JT，Slavicek JM，Rohrmann GF，1999. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*，253：17 – 34.

Lepore LS，Roelvink PR，Granados RR，1996. Enhancin，granulosis virus protein that falicitates nucleopolyhedrovirus（NPV）infections，is a metalloprotease. *J*. *Invertebr*. *Pathol*.，68：131 – 140.

Li Q，Li L，Moore K，Donly C，Theilmann DA，Erlandson M，2003. Characterization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancin and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus recombinant. *J*. *Gen*. *Virol*.，84：123 – 132.

Li ZG，Yin J，Zhong J，2002. Recombinant expression and activity analysis of TnGV enhancin in AcMNPV. *Acta Virologica Sinica*，17（4）：326 – 330.［李志广，尹隽，钟江，2002. TnGV 增强蛋白在 AcMNPV 中的表达和活性分析. 中国病毒学，17（4）：326 – 330］

Peng J，Zhong J，Granados RR，1999. The baculovirus enhancin increases the permeability of insect peritrophic matrix. *J*. *Insect Physiol*.，45（1）：159 – 166.

Popham HJ，Bischoff DS，Slavicek JM，2001. Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancin genes contribute to viral potency. *J*. *Virol*.，75：8 639 – 8 648.

Roelvink PW，Corsaro BG，Granados RR，1995. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *J*. *Gen*. *Virol*.，76：2 693 – 2 705.

Tanada Y，1985. A synopsis of studies on the synergistic properties of an insect baculovirus：a tribute to Edward A. Steinhaus. *J*. *Invertebr*. *Pathol*.，45：125 – 138.

Wang P，Granados RR，1997. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. *USA*，94：6 977 – 6 982.

Wang P，Hammer DA，Granados RR，1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *J*. *Gen*. *Virol*.，75：1 961 – 1 967.

Yamamoto T，Tanada Y，1978. Phospholipid，an enhancing component in the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm，*Pseudaletia unipuncta*. *J*. *Invertebr*. *Pathol*.，31：48 – 56.

Yamamoto T，Tanada Y，1980. Physiochemical properties and location of capsule components，in particular the synergistic factor，in the occlusion body of a granulosis virus of the armyworm，*Pseudaletia unipuncta*. *Virology*，107：434 – 440.

（责任编辑：黄玲巧）